

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年2月27日 (27.02.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/016906 A1(51) 国際特許分類: G01N 33/53, 33/577,
C07K 16/18, C12P 21/08

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/08331

(22) 国際出願日: 2002年8月16日 (16.08.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-248047 2001年8月17日 (17.08.2001) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): レビ
オ・ジェン株式会社 (REBIO GEN, INC.) [JP/JP]; 〒
192-0031 東京都八王子市小宮町51番地4 Tokyo (JP).
学校法人 慶応義塾 (KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒
108-0073 東京都港区三田二丁目15番45号 Tokyo
(JP).

(72) 発明者; および

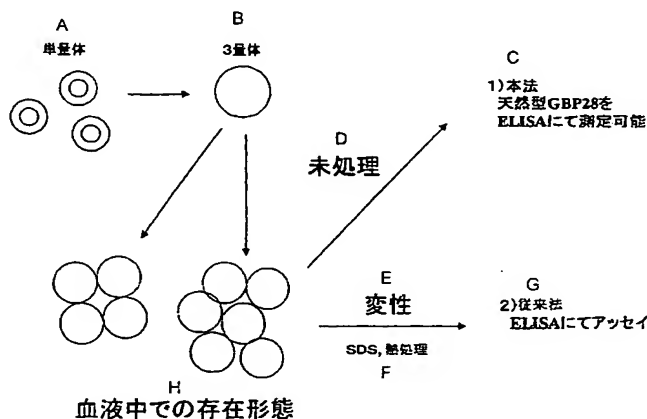
(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 富田 基郎

(TOMITA, Motowo) [JP/JP]; 〒225-0002 神奈川県横浜
市青葉区美しが丘3-44-38 Kanagawa (JP). 中野 泰子
(NAKANO, Yasuko) [JP/JP]; 〒157-0067 東京都世田
谷区喜多見7-16-19 Tokyo (JP). 広瀬 寛 (HIROSE, Hi-
roshi) [JP/JP]; 〒154-0002 東京都世田谷区下馬5-8-14
Tokyo (JP). 松原 亨一 (MATSUBARA, Koichi) [JP/JP];
〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地
中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5
森ビル3階 Tokyo (JP).(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF DIAGNOSING OR MONITORING SACCHAROMETABOLIC ERROR

(54) 発明の名称: 糖代謝異常の診断又はモニタリング方法

(57) Abstract: A method of
finding adult diseases such as
type 2 diabetes, in which insulin
resistance participates, at the early
stage by quantifying GBP28 with
the use of a monoclonal antibody
whereby adiponectin (GBP28)
in a sample can be assayed;
and a method of monitoring the
therapeutic effect of a remedy for
type 2 diabetes.

A... MONOMER

B... TRIMER

C... 1) INVENTION METHOD

NATURAL TYPE GBP28 CAN BE ASSAYED BY ELISA

D... UNTREATED

E... DENATURATION

F... SDS, HEAT TREATMENT

G... 2) CONVENTIONAL METHOD

ASSAY BY ELISA

H... MORPHOLOGY IN BLOOD

[続葉有]

WO 03/016906 A1



(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特
許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約:

本発明は、試料中のアディポネクチン (GBP28) を測定し得るモノクローナル抗体を用いてGBP28を定量的に測定することにより、2型糖尿病等インスリン抵抗性の関連する成人病を早期発見する方法及び2型糖尿病治療剤の治療効果をモニタリングする方法を提供する。

明 細 書

糖代謝異常の診断又はモニタリング方法

技術分野

本発明は、試料中のアディポネクチン (GBP28) を測定することにより糖代謝異常を診断又はモニタリングする方法、試料中のGBP28を測定することにより2型糖尿病治療剤の治療効果をモニタリングする方法、試料中の天然型GBP28を測定することを特徴とするGBP28の測定方法、及び、天然型GBP28に対して特異的に反応するモノクローナル抗体に関する。

背景技術

糖尿病に罹患している患者は世界中で1億人以上に達しており、その90%以上が2型糖尿病である (Schoonjans, K. 及び Auwerx, J., Lancet 355:1008-1010, 2000)。2型糖尿病は、インスリン分泌障害及び／又はインスリン抵抗性を特徴とする (DeFronzo, R. A. ら, Diabetes Care 15:318-368, 1992)。チアゾリジンジオンは、動物実験及び臨床研究の双方においてインスリン抵抗性を改善することが示された。2型糖尿病患者にこれらの薬剤を投与すると、インスリンの作用が上昇する結果として、血糖値、糖ヘモグロビン、及び血清インスリンレベルが低下する (Schwartz S. ら, N. Engl. J. Med. 338:861-866, 1998)。

一方、脂肪細胞由来の血漿タンパク質であるアディポネクチン (Maeda, K. ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 221:286-289, 1996; Arita, Y. ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 257:79-83, 1999) [別名ゼラチン結合タンパク質28 (GBP28) (Nakano, Y. ら, J. Biochem. 120:803-812, 1996; Saito, K. ら, Gene 229:67-73, 1999; Saito, K. ら, Biol. Pharm. Bull. 22:1158-1162, 1999)] は、in vitroにおいて損傷した血管壁に接着し、内皮性NF- κ Bシグナル伝達を阻害し (Ouchi, N. ら, Circulation 102:1296-1301, 2000)、HB-EGF及びPDGFによって誘導される平滑筋の細胞増殖を抑制する (Matsuzawa, Y. ら, Ann. N. Y. Acad. Sci. 892:146-154, 1999)。さらに、肥満患者においてはこのタンパク質の血清レベルは低いことが報告されており (Arita, Y. ら, Biochem. Biophys. Res. Co

mmun. 257:79-83, 1999)、また、2型糖尿病患者及び冠状動脈疾患患者においても前記血清レベルが低下していることが報告されている (Hotta, K.ら, Arterioscler Thromb. Vasc. Biol. 20:1595-1599, 2000)。

従来、2型糖尿病と関連する因子として、血中グルコース、HbA_{1c}、血清インスリン、HOMA-IR等が知られている。しかしながら、これらを2型糖尿病の診断又は治療効果のモニタリングの指標として使用するには、操作性及び／又は感度の点で不十分であった。また、上述のように、GBP28についても2型糖尿病との関連についての示唆がなされていたが、実際に臨床の場において、GBP28が2型糖尿病の診断及び治療効果モニタリングに利用可能であるか否かについては十分な知見が得られていなかった。

一方、GBP28の測定方法としては、大本らによるELISA法が知られている (Ohmotoら, BIO Clinica 15(10) 758-761, 2000 ; 特開2000-304748)。しかしながら、血液中の天然型GBP28は単量体3個から構成され、更にこの3量体が4～6個ずつ凝集した存在形態をとっている (J. Biochem. 120, 803-812, 1996) のに対し、かかる従来法は単量体構造のGBP28に対するモノクローナル抗体を用いていることから試料中の天然型GBP28を変性させなければならず、測定にあたって検体をSDS溶液と混合し、100℃で熱処理を行うことが必要であり、操作が煩雑であった。また、かかる従来法は天然型GBP28を変性させた形態で測定するものであり、天然の状態のGBP28を直接測定することができなかった。

発明の概要

本発明者等は、上記課題を解決するために、臨床において2型糖尿病等の糖代謝異常の診断及び治療効果モニタリングの指標となり得る因子を探索すべく、2型糖尿病関連の種々のパラメーターにつき2型糖尿病患者における血中濃度を測定し、鋭意検討を重ねた結果、後述の実施例に示すように、GBP28の測定が糖代謝異常の診断及びその治療剤の治療効果モニタリングに非常に有効であることを見出した。また、GBP28を凝集した形態のままで測定することにより、試料中のGBP28を天然の状態で簡便そして迅速に測定できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち本発明は、以下の（１）～（１３）を提供する。

- （１） 試料中のアディポネクチン（GBP28）を測定することにより糖代謝異常を診断又はモニタリングする方法。
- （２） 糖代謝異常が２型糖尿病である、上記（１）に記載の方法。
- （３） GBP28が天然型である、上記（１）又は（２）に記載の方法。
- （４） 試料中のGBP28を測定することにより２型糖尿病治療剤の治療効果をモニタリングする方法。
- （５） GBP28が天然型である、上記（４）に記載の方法。
- （６） ２型糖尿病治療剤がチアゾリジン誘導体である、上記（４）又は（５）に記載の方法。
- （７） 抗原－抗体反応を用いて測定することを特徴とする、上記（５）又は（６）に記載の方法。
- （８） 試料中の天然型GBP28を測定することを特徴とする、GBP28の測定方法。
- （９） GBP28の測定を、天然型GBP28に特異的に反応するモノクローナル抗体を使用して行うことを特徴とする、上記（１）～（８）のいずれかに記載の方法。
- （１０） ハイブリドーマFERM BP-7660またはFERM BP-7661が産生するモノクローナル抗体を使用することを特徴とする、上記（９）に記載の方法。
- （１１） GBP28の測定を、固相法、競合法、凝集法、比濁法、サンドウィッチ酵素抗体法のいずれかによって行うことを特徴とする、上記（１）～（１０）のいずれかに記載の方法。
- （１２） 試料が、血清、血漿、関節液、胸水、組織抽出液、組織、培養上清又は尿であることを特徴とする、上記（１）～（１１）のいずれかに記載の方法。
- （１３） GBP28の３量体構造及び／又はGBP28の３量体が凝集した構造を有する天然型GBP28に対して特異的に反応するモノクローナル抗体。
- （１４） ハイブリドーマFERM BP-7660またはFERM BP-7661が産生するものである、上記（１３）に記載のモノクローナル抗体。
- （１５） 天然型GBP28に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を含む、試料中の天然型GBP28を測定するためのキット。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願２００１－２４８０４７

号の明細書及び／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の方法及び従来法の原理を模式的に示す。

図 2 は、10名の2型糖尿病患者（日本人男性）に対するピオグリタゾンの3ヶ月投与（30mg／日）による血清アディポネクチンレベルの変化を示す。

○—○：食事療法及びピオグリタゾン（n = 7）

■—■：食事療法、スルホニルウレア剤及びピオグリタゾン（n = 3）

図 3 は、GBP28の検量線を示す。

図 4 は、GBPアッセイの希釈直線性を示す。

発明を実施するための最良の形態

GBP28は、ヒトにおいては配列番号 1 に示すアミノ酸配列及び配列番号 2 に示すヌクレオチド配列を有することが知られている。また、GBP28は、血液中においては単量体 3 個から構成される 3 量体が更に 4 ～ 6 個ずつ凝集した存在形態をとっていることが知られている（J. Biochem. 120, 803-812, 1996）。

本発明者等は、健常人由来の血液等の試料中のGBP28濃度が 2 型糖尿病の特徴であるインスリン抵抗性の指標に関わるインスリン、インスリン抵抗性指数（HOMA-IR）、中性脂肪、HDL-コレステロール、LDL-コレステロールと相関関係を示したことが、及び、2 型糖尿病患者由来の血液等の試料中のGBP28濃度が、2 型糖尿病治療剤の治療効果をモニタリングする上で、従来 2 型糖尿病の指標とされていた血漿グルコース、HbA_{1c}、血清インスリン、HOMA-IRと比較して大きな変化率を示す事を確認したことから、血液等の試料中のGBP28濃度が 2 型糖尿病等の糖代謝異常の診断及び 2 型糖尿病等の治療剤の治療効果のモニタリングにおける新たな指標として非常に有効であることを見出した。

従って、本発明者等は、試料中のGBP28、好ましくは天然型GBP28を測定することにより 2 型糖尿病等の糖代謝異常を診断する方法及び 2 型糖尿病治療剤の治療効果をモニタリングする方法を提供する。

本発明において、試料とは、血清、血漿、関節液、胸水、組織抽出液、組織、

培養上清又は尿を挙げることができるが、本発明はこれらに特に限定されるものではない。

糖代謝異常としては、糖尿病（1型糖尿病、2型糖尿病）や糖尿病合併症（高血圧、高脂血症、動脈硬化、緑内障）等が挙げられ、特に本発明は2型糖尿病の診断又は治療剤による治療効果のモニタリングのために好適である。

糖代謝異常の治療剤としては、公知の種々のものが使用できる。例えば、2型糖尿病の治療剤としては、一般にグリベンクラミド、グリクラジド、トルブタミド、グリメピリド等のスルホニルウレア剤、ナテグリニド等の即効型インスリン分泌促進剤、ボグリボース、アカルボース等の α グルコシダーゼ阻害剤、ピオグリタゾン等のインスリン抵抗性改善剤、メトホルミン等のビグアナイド剤が挙げられ、本発明の方法を好適に適用することができる。特に好適な2型糖尿病治療剤としては、ピオグリタゾン、トログリタゾン等のチアゾリジン誘導体が挙げられる。

GBP28の測定は、特に限定されるものではないが、GBP28、好ましくは、GBP28の3量体構造及び／又はGBP28の3量体が凝集した構造を有する天然型GBP28に特異的に反応するモノクローナル抗体を使用し、固相法、競合法、凝集法、比濁法、サンドウィッチ酵素抗体法等の当分野において通常行われるいずれかの方法によって行うことができる。特に固相酵素免疫検定法（ELISA）を用いて測定するのが好ましい。酵素免疫検定法は、当分野において通常行われる方法であり、当業者であれば、上記のGBP28に特異的に反応する抗体を用いて行うことができる。

上記測定方法において天然型GBP28に特異的に反応するモノクローナル抗体を使用する場合には、天然の状態では存在しない、変性した構造やGBP28単量体を測定しないようにすることができる。具体的には、GBP28がコラーゲン様の立体構造を組んでいるときの3量体において初めて出現する部位を認識するモノクローナル抗体を作製し使用することが特に好ましい。

図1に、GBP28を測定するための本発明の方法及び従来法の原理を模式的に示す。従来法では、GBP28に対するモノクローナル抗体を取得するために、遺伝子組換え大腸菌によって発現されたGBP28を免疫原として用いている。しかし、組換えGBP28は封入体として菌中に存在するため、該蛋白の精製時には塩酸グアニジン、尿素、還元剤などによる処理が必要である。そのため、免疫原として用いる

GBP28には変性型かつ単量体構造のGBP28しか用いることができない。その結果、得られるモノクローナル抗体は変性した単量体GBP28にのみ反応するものであり、試料中の天然型GBP28を測定するにあたっては、試料中の該GBP28を単量体GBP28に変性させるための処理が予め必要である。これに対して、本発明の方法は、天然型GBP28に特異的に反応するモノクローナル抗体を使用するので、血液中に存在する天然型GBP28を処理することなくそのまま測定することができるものである。

本発明のモノクローナル抗体は、例えば、天然型GBP28を抗原として当分野において一般的な方法によって得ることができる。天然型GBP28は、そのゼラチン結合性を利用して、例えば大量のヒト血漿をGelatin-cellulofineカラム (J. Biochem. 120, 803-812, 1996) に通すことによって精製することができる。この天然型GBP28を使用し、例えば、動物に免疫し、この免疫動物から脾臓又はリンパ節を採取する。この脾臓又はリンパ節に含まれる抗体産生細胞とミエローマ細胞とをポリエチレングリコールなどを用いて融合し、ハイブリドーマを調製する。目的のハイブリドーマをスクリーニングし、これを培養し、その培養上清からモノクローナル抗体を調製することができる。培養は、in vitroで行っても良いが、in vivoで行うこともでき、例えばマウス等の腹腔内にハイブリドーマを投与した後、腹水から目的の抗体を得ることができる。モノクローナル抗体の精製は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテインAや固定化抗原を用いたアフィニティー精製により行うことができる。これにより調製された抗体は、GBP28の測定のために用いられる他、GBP28の発現異常に起因する疾患の抗体治療等に利用することも可能である。

本発明において特に好適に使用できる抗GBP28モノクローナル抗体の特徴は以下の通りである。

使用したミエローマ細胞株：P3U1

抗原：ヒト血清より単離精製したGBP28 (約50 μ g) 溶液を完全アジュバントとミセル化してマウス腹腔内に投与。2週間後にブーストしてから3日目に脾臓を摘出してB細胞を採取。

モノクローナル抗体を調整したクローン数：3個 (IH5、6、7)

Ig型：全てIgG κ 型

エピトープ：GBP28の3量体で熱変性されていないもののみ認識する。従って、コラーゲン様の立体構造を組んでいるときの3量体において初めて出現する部位と考えられる。

尚、本発明において好適に使用できる抗GBP28モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマIH-6及びIH-7は、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに2001年7月12日付けでFERM BP-7660及びFERM BP-7661という受託番号で寄託されている。

試料中のGBP28を測定することにより糖代謝異常を診断する方法及び治療剤による治療効果をモニタリングする方法は、具体的には、例えば、次の様にして行うことができる。

1) GBP28濃度の測定

患者等から採取した血清等を希釈し、マウス抗GBP28モノクローナル抗体で被覆した96ウェルのマイクロタイタープレートに添加し、血清中のGBP28をウェル上のマウス抗GBP28モノクローナル抗体に結合させる。ウェルを洗浄後、酵素標識マウス抗GBP28モノクローナル抗体を添加し、ウェル上に存在するマウス抗GBP28モノクローナル抗体に結合させる。さらにウェルを洗浄後、酵素に対する基質溶液を加えることにより発色反応を起こさせ、発色反応停止後、吸光度を測定する。予め、同様の方法で既知濃度のGBP28標準溶液について吸光度を測定し、GBP28の濃度に対する吸光度の標準曲線を作成しておき、測定した吸光度の値を該標準曲線から、GBP28の濃度に換算することによって、患者等から採取した血清等中のGBP28の濃度を測定することができる。

2) 糖代謝異常を診断又はモニタリングする方法

GBP28を2型糖尿病等の糖代謝異常の診断における指標として使用する場合は、例えば、上述した測定法により測定したGBP28の濃度値を、予め求めておいた正常値若しくは境界値と比較する。

3) 治療剤の治療効果をモニタリングする方法

また、GBP28を2型糖尿病治療剤の治療効果のモニタリングにおける指標として使用する場合は、例えば、2型糖尿病患者から治療開始前と治療開始後の血液を採取し、上述した測定法によりGBP28を測定し、治療開始前後の血液中のGBP28含量からの変化率を計算し、治療効果の判定を行う方法が挙げられる。治療開始

後の血中GBP28濃度が治療開始前に比べ増加した場合、治療剤による治療効果が認められたとの判定ができる。前後の血液採取の間隔は1ヶ月から3ヶ月が好ましい。

本発明はまた、天然型GBP28に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を含む、試料中の天然型GBP28を測定するためのキットである。本発明のキットは、上記本発明の抗体の他、緩衝剤、ペルオキシダーゼ等の標識体で標識した二次抗体、標準液、ブロッキング液、ペルオキシダーゼ等の酵素基質液、洗浄液等を適宜含んでいても良い。本発明のモノクローナル抗体は、GBP28の3量体構造を認識するものであるため、非標識のモノクローナル抗体をプレート上に固定してGBP28含有試料を添加した後、標識した同じ種類のモノクローナル抗体を使用してサンドイッチアッセイを行うことができる。

実施例

以下、本発明を実施例を挙げて更に説明するが、本発明はこれら実施例に何ら限定されるものではない。

尚、各実施例において、統計的解析は全てMacintoshのためのStatView（登録商標）プログラム（version 4.5-J, Abacus Concepts Inc., Berkeley, California）を用いて行った。ベースライン及び3ヶ月間の追跡データの比較のためにWilcoxon signed-rankテスト（two-tailed）を行い、GBP28及び他のパラメーターの変化率の比較のために、有意性はPearsonの相関係数と偏相関係数を用いて評価した。血清インスリン、TG及びGBP28レベル、並びにHOMA-IRは、大規模の研究においてlog変換すると正規分布するため、これらのパラメーターについては対数を解析に使用した。全てのデータは平均±S.D.で表わし、 $p < 0.05$ の場合に統計的に有意であるとした。

〔実施例1〕 各パラメーターの測定

食事療法のみを受けている（ $n = 7$ ）か、又は食事療法と共にスルホニルウレア剤の投与を受けている（ $n = 3$ ）、40～66歳（ 57.7 ± 7.4 ）の10名の2型糖尿病男性患者に対して、チアゾリジン系薬ピオグリタゾンの3ヶ月投与の前後に以下のパラメーターについて調べた。各患者の体重、血糖及び血圧、及び各患者に対する治療は検討開始前少なくとも3ヶ月間は一定していた。3名の患者

に対するスルホニルウレア剤の投与量は期間中一定とした。10名の患者全員に毎日朝食後にピオグリタゾン投与した（経口、30mg/日）。開始時点における患者の年齢、体格指数（BMI）、及び臨床プロファイルを表1に示す。

表1

2型糖尿病患者の臨床プロファイル		
パラメーター	範囲	
n	10	
年齢（歳）	57.4±7.4	[40-66]
身長（cm）	164.2±5.2	[156.0-171.6]
体重（kg）	71.3±9.8	[57.3-85.1]
体格指数（kg/m ² ）	26.4±3.2	[22.4-32.5]
罹患期間（年）	7.0±4.5	[2.0-15.0]
グルコース（mmol/l）	8.6±1.4	[6.9-11.3]
HbA _{1c} （%）	6.7±0.8	[5.3-8.2]

データはnもしくは平均値±SD

尚、表中、データはn又は平均（±S.D.）を示す。

最大血圧（SBP）及び最小血圧（DBP）は少なくとも5分間休憩した後に座った状態で2回測定した。身長、体重、空腹時血漿グルコース（FPG）、HbA_{1c}、血清インスリン、アディポネクチン、総コレステロール（TC）、中性脂肪（TG）、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、及び尿酸レベルは、一晚絶食後の朝に測定した。血漿グルコース、脂質及び尿酸は一般的な自動化測定方法によって測定した。血清インスリン濃度は、以前記載されているように（Kawai, T.ら, Metabolism 48:1102-1107, 1999; Hirose, H.ら, Clin. Sci. (Colch) 94:633-636, 1998; Hirose, H.ら, J. Hypertens. 16:2007-2012, 1998; Hirose, H.ら, Clin. Sci. (Colch) 100:145-150, 2001）、市販のキット（Tosoh, Tokyo）EIAによって測定した。インスリン抵抗性指数は、ホメオスタシスモデルアセスメント（HOMA-IR）によって評価した（Matthews, D.R.ら, Diabetologia 28:412-419, 1985; Rudenski, A.S.ら, Metabolism 40:908-917, 1991）。

結果を表2に示す。

表 2

ピオグリタゾン 3 ヶ月投与の各パラメーターに対する効果

パラメーター	ベースライン		3 ヶ月追跡後		3 ヶ月間の変化率
	n	10	n	10	
体格指数 (kg/m ²)		26.4±3.2	27.0±3.5		* 2.1±2.2
最大血圧体格指数 (kg/m ²)		149±18	138±15		** -7.0±4.9
最小血圧体格指数 (kg/m ²)		89±13	83±9		* -6.3±6.9
空腹時グルコース (mmol/l)		8.6±1.4	7.0±1.0		** -18.2±9.3
HbA1c (%)		6.7±0.8	6.1±0.6		* -9.0±8.8
血清インシュリン (pmol/l) (log)		54±11	30±8		** -23.7±13.5
HOMA-IR (log)		3.4±1.9	1.6±1.3		* -62.6±22.6
総コレステロール (mg/dl)		208±26	218±35		4.8±10.9
中性脂肪 (mg/dl) (log)		134±2	127±2		-1.0±6.3
HDL コレステロール (mg/dl)		51.7±9.4	52.1±7.3		2.0±11.2
LDL コレステロール (mg/dl)		124±24	138±24		* 12.3±12.8
尿酸 (mg/dl)		5.9±1.1	5.6±1.3		-5.0±9.5
GBP28 (μg/l) (log)		4.8±1.7	14.4±2.1		** 80.9±58

データはnもしくは平均値±SD

* P<0.05 (Wilcoxon テスト)

** P<0.01 (Wilcoxon テスト)

尚、表中、データはn又は平均(±S.D.)を示す。

表2に示すように、ピオグリタゾンの3ヶ月投与により、最大血圧、最小血圧、空腹時血漿グルコース、HbA_{1c}、血清インスリン及びHOMA-IRは顕著に低下した。体格指数(BMI)及びLDL-コレステロールは上昇したが、中性脂肪、HDL-コレステロール及び尿酸は有意な変化がなかった。

血糖及び血圧コントロールに対する効果は、対照食事療法群とは違い、トログリタゾン(Kawai, T.ら, Metabolism, 48:1102-1107, 1999)と同様に認められた。血圧に対するチアゾリジンジオンの効果に関しては、トログリタゾンはインスリン抵抗性動物(Yoshioka, S.ら, J. Hypertens. 18:1857-1864, 2000)及び臨床研究(Ogihara, T.ら, Am. J. Hypertens. 8:316-320, 1995)において血圧を低下させることが報告されている。LDL-コレステロールに対する効果については、トログリタゾン(Schwartz S.ら, N. Eng. J. Med. 338:861-866, 1998)又はロジグリタゾン(Balfour, J.A.およびPlosker, G.L., Drugs 57:921-930, 1999)の投与がLDL-コレステロールの上昇に関与することが報告されている。ピオグリタゾンの投与によってもLDL-コレステロールがわずかに増加したが、3ヵ月後に顕著であった。

〔実施例2〕 脂肪分布の測定

実施例1と同じ患者に対して、ピオグリタゾン3ヶ月投与前後の脂肪分布を測定した。皮下脂肪及び内臓脂肪分布は、Tokunagaらの臍高レベルにおけるコンピュータ連動断層撮影(CT)スキヤニング方法(Tokunaga, K.ら, Int. J. Obes. 7:437-445, 1983)を改変して-150~-50 Hounsfieldユニット領域を測定することによって決定した。CT画像は本発明者等が先に報告したもの(Kawai, T.ら, Metabolism, 48:1102-1107, 1999)と同じプロトコルでベースライン及び3ヶ月治療後で撮影した。V/S比率は臓器内脂肪領域(VFA)を皮下脂肪領域(SFA)で割った値として計算した。結果を表3に示す。

表 3

ピオグリタゾン 3 ヶ月投与の体脂肪分布に対する効果

パラメーター	ベースライン	3 ヶ月追跡後	3 ヶ月間の変化率
n	10	10	
臓器内脂肪領域 (cm ²)	165±38	180±46	11.3±21.3
皮下脂肪領域 (cm ²)	155±69	179±81	* 16.1±18.7
V/S 比率	1.2±0.3	1.1±0.3	-4.0±11.2

データは n もしくは平均値±SD

* P<0.05 (Wilcoxon テスト)

尚、表中、データは n 又は平均 (±S.D.) を示す。

表 3 に示すように、ピオグリタゾン 3 ヶ月投与の後、BMI 及び皮下脂肪領域 (SFA) が顕著に増加した。これはトログリタゾンの結果 (Kawai, T. ら, Metabolism, 48:1102-1107, 1999; Kelly, I.E. ら, Diabetes Care 22:288-293, 1999; Mori, Y. ら, Diabetes Care 22:908-912, 1999) と本質的に同じであった。対照的に、臓器内脂肪領域 (VFA) は減少せず、むしろわずかに増加し、トログリタゾンで得られた知見と異なっていた。この違いの理由は明らかでないが、トログリタゾンのビタミン E 構造、及び/又は PPAR α の機能のような構造的差異による可能性がある。尚、VFA は増加傾向にあり、V/S 比率は減少傾向にあったが、これらの差異において統計学的有意性は得られなかった。

【実施例 3】 GBP28 の測定

実施例 1 と同じ患者に対して、ピオグリタゾン 3 ヶ月投与前後の GBP28 の血中濃度を測定した。

抗ヒト GBP28 モノクローナル抗体は以下のようにして作製した。まず、ヒト血清より単離精製した GBP28 (約 50 μ g) 溶液を完全アジュバントとミセル化してマウス腹腔に投与し、2 週間後にブーストしてから 3 日目に脾臓を摘出して B 細胞を採取した。この B 細胞とミエローマ細胞とを融合してハイブリドーマを調製し、目的のハイブリドーマをマウスに腹腔内投与した後、(20 日後に) 腹水を DEA E-Sepharose Fast Flow で処理することにより目的のモノクローナル抗体を得た。

ELISA による GBP28 の測定は以下のようにして行った。GBP28 の標準サンプル、4

41倍希釈の未知サンプル及び対照サンプル各100 μ lを、マウス抗GBP28モノクローナル抗体で被覆した96ウェルのマイクロタイタープレートに添加した。プレートを60分間インキュベートした後、ウェルを洗浄し、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識マウス抗GBP28モノクローナル抗体と共に更に30分間インキュベートした。プレートを再度洗浄し、テトラメチルベンジジン試薬と共に30分間インキュベートした。次いで、各ウェルに0.36Nの硫酸水溶液100 μ lを添加して反応を止め、450nmにおける吸光度を測定した。アッセイ内及びアッセイ間係数はそれぞれ4.8-4.9%及び3.3-6.8%であった。

3ヶ月間のピオグリタゾン投与の結果、10名の患者全てにおいて血清アディポネクチンレベルは上昇した（ベースラインの値の1.5～6.8倍、平均して3倍）（表2及び図2）。更に、GBP28及び表2及び3に示す他のパラメーター間の3ヶ月間の変動について検討した。各パラメータの測定値（一部は対数値）の変化率を比較した結果、従来から知られている2型糖尿病関連因子である血中グルコース（18.2%）、HbA_{1c}（9.0%）、血清インスリン（23.7%）、HOMA-IR（62.6%）等よりも、試料中のGBP28濃度は大きな変化率（80.9%）を示した。

【実施例4】 健常人での測定結果

実施例3では、GBP28は2型糖尿病患者において、2型糖尿病治療剤であるチアゾリジン誘導体の治療効果のモニタリングに用いることができることが明らかとなり、GBP28濃度はインスリン抵抗性の指標になる可能性が予測できた。そこで、健常人を対象とし、血中のGBP28濃度とインスリン抵抗性との関わりが報告されているパラメーターとの関係について調べた。

毎年来院して健康診断を受けている30歳から65歳の980名を対象にインスリン抵抗性との関わりが報告されているパラメーターについて調べた。対象者の内訳としては、男性714名、女性266名であり、内分泌疾患患者及び腎臓ないし肝臓に重篤な疾患をもつ患者は測定対象から除いた。また、インスリンや抗糖尿病薬、抗高脂血症薬の治療を受けている患者も測定対象から除いた。

測定したパラメーターとしては、最大血圧（SBP）及び最小血圧（DBP）は少なくとも5分間休憩した後に座った状態で2回測定した。年齢、BMI、心拍数、空腹時血漿グルコース（FPG）、血清インスリン、アディポネクチン、総コレステ

ロール (TC) 、中性脂肪 (TG) 、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、及び尿酸レベルは、一晩絶食後の朝に測定した。血漿グルコース、尿酸は一般的な自動化測定方法によって測定した。血清インスリン濃度は、先に記載されているように、市販のキット (Tosoh、Tokyo) EIAによって測定した。インスリン抵抗性指数は、ホメオスタシスモデルアセスメント (HOMA-IR) によって評価した。

本検討で測定した各パラメーターとGBP28との比較結果を男性については表 4 に、女性については表 5 に示す。

表 4

vs. log[GBP28]	A			B		C		D	
	平均 ± SD			r	P	r	P	r	P
	(years)						
年齢(歳)	(years)	0.044	NS	-	-	-	-
体格指数	(kg/m ²)	23.2 ± 2.7	<0.0001	-	-	-0.257	0.0069
体脂肪	(%)	21.8 ± 4.8	<0.0001	-0.177	0.065	-	-
最大血圧	(mm Hg)	124 ± 18	<0.0001	-0.052	NS	-0.100	NS
最小血圧	(mm Hg)	77 ± 12	0.0002	-0.047	NS	-0.064	NS
心拍数	(beats/min)	75 ± 13	NS	-0.033	NS	-0.012	NS
グルコース	(mg/dl)	95 ± 16	0.0002	-0.067	0.068	-0.057	NS
インシュリン(log)	(μ U/ml)	5.58 ± 3.60	<0.0001	-0.229	<0.0001	-0.362	<0.0001
HOMA-IR (log)	(-)	1.33 ± 0.98	<0.0001	-0.237	<0.0001	-0.362	<0.0001
総コレステロール	(mg/dl)	200 ± 31	0.08	-0.013	NS	0.018	NS
トリグリセリド(log)	(mg/dl)	121 ± 84	<0.0001	-0.197	<0.0001	-0.207	0.0005
HDL-コレステロール	(mg/dl)	54 ± 13	<0.0001	-0.330	<0.0001	0.293	<0.0001
LDL-コレステロール	(mg/dl)	126 ± 28	<0.0001	-0.083	0.024	-0.030	NS
尿酸	(mg/dl)	6.2 ± 1.2	<0.0001	-0.174	<0.0001	-0.214	0.0003
データは平均値±SD				NS:P>0.1		n=330 (対体脂肪)			

表 5

vs. log[GBP28]	A			B		C		D	
	平均 ± SD	r	P	r	P	r	P	r	P
年齢(歳)	(years)	41.7 ± 9.9	0.089	NS	-	-	-	-	-
体格指数	(kg/m ²)	20.7 ± 2.7	-0.226	0.0002	-	-	-	0.214	NS
体脂肪	(%)	21.8 ± 4.8	-0.360	<0.0001	-0.566	0.0073	-	-	-
最大血圧	(mm Hg)	112 ± 16	-0.037	NS	0.050	NS	0.053	NS	NS
最小血圧	(mm Hg)	68 ± 11	-0.043	NS	0.016	NS	0.040	NS	NS
心拍数	(beats/min)	74 ± 10	0.029	NS	0.072	NS	0.067	NS	NS
グルコース	(mg/dl)	90 ± 9	-0.128	0.037	-0.036	NS	-0.072	NS	NS
インシュリン(log)	(μ U/ml)	4.82 ± 2.50	-0.220	0.0003	-0.137	0.040	-0.127	NS	NS
HOMA-IR (log)	(-)	1.08 ± 0.61	-0.225	0.0002	-0.134	0.047	-0.126	NS	NS
総コレステロール	(mg/dl)	193 ± 33	0.010	NS	0.006	NS	0.055	NS	NS
トリグリセリド(log)	(mg/dl)	68 ± 37	-0.306	<0.0001	-0.275	<0.0001	-0.134	NS	NS
HDL-コレステロール	(mg/dl)	69 ± 15	0.393	<0.0001	0.345	<0.0001	0.280	0.0007	0.0007
LDL-コレステロール	(mg/dl)	112 ± 28	-0.175	0.0042	-0.199	0.0041	-0.131	NS	NS
尿酸	(mg/dl)	4.3 ± 0.94	-0.018	NS	-0.025	NS	0.014	NS	NS

n=330 (対体脂肪)

NS:P>0.1

データは平均値±SD

尚、表中、データは平均±SD及び相関係数そしてp値を示す。血中のGBP28は0.4 μ g/mLから61.2 μ g/mLと幅広い濃度分布を示した。男性の血中GBP28濃度は7.2 ± 4.6 μ g/mL、女性の血中GBP28濃度は13.3 ± 7.3 μ g/mL、で、男性よりも女性のほうが高い濃度を示した。

表4及び表5に示すように、血中のGBP28の濃度はBMI、最大血圧、最小血圧、空腹時血漿グルコース、インスリン、HOMA-IR、中性脂肪、LDL-コレステロールそして尿酸と負の相関関係を示した。またHDL-コレステロールとは正の相関関係を示した。また、年齢とBMIでの補正を加えてGBP28と各パラメーターとの比較を行った場合にはインスリン（男性 $r = -0.229$ 、女性 $r = -0.137$ ）、HOMA-IR（男性 $r = -0.237$ 、女性 $r = -0.134$ ）、中性脂肪（男性 $r = -0.197$ 、女性 $r = -0.275$ ）、HDL-コレステロール（男性 $r = -0.330$ 、女性 $r = 0.345$ ）、LDL-コレステロール（男性 $r = -0.083$ 、女性 $r = -0.199$ ）と $p < 0.05$ の信頼性で統計学的に有意な相関関係を示した。その結果、HOMA-IRや、インスリン、中性脂肪、HDL-コレステロール、LDL-コレステロールと相関関係を示した。

以上から、健常人においても、GBP28濃度がインスリン抵抗性の指標になりうることを確認された。

〔実施例5〕 試料中の天然型GBP28を測定するためのキットの製造

A. 本発明のキットに使用する材料

(1) 抗ヒトGBP28モノクローナル抗体コート・プレート

・抗ヒトGBP28モノクローナル抗体溶液

マウス腹水をDEAE-Sepharose Fast Flowで処理することにより得られた抗ヒトGBP28モノクローナル抗体を、0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）にて10 μ g/mLとした。

・プレート調製用洗浄液組成

表 6

試薬	濃度
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	40mM
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	60mM
Tween 20	0.05%
pH7.0	—

・ブロッキング溶液組成

表 7

試薬	濃度
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	40mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	60mM
BSA	1.0%
pH7.0	—

1. Nunc製MaxiSorp F8プレートに抗体溶液を120 μL /well分注し、4℃で一晩静置。
2. 抗体溶液を除いた後、洗浄液で2回洗浄。
3. ブロッキング溶液を200 μL /well分注し、37℃で一晩静置。
4. ブロッキング溶液を除去。
5. 減圧下で一晩置き十分に乾燥させた後、密封し4℃に保存。

(2) 標準液

・GBP28抗原溶液

抗ヒトGBP28モノクローナル抗体を結合させたアフィニティーカラムにより健康人プール血清からGBP28を精製した後、更にゲル濾過を行った。GBP28濃度は280nmの吸光度より求めた。(Abs. 280nm=1.000の時の濃度を1.0mg/mLとした。)

・希釈用緩衝液

表 8

試薬	濃度
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	16mM
BSA	1.0%
pH7.4	—

GBP28抗原溶液を上記組成の希釈用緩衝液にて希釈することにより、GBP28濃度

を0、2、5、10、25、50ng/mLとした。

(3) ペルオキシダーゼ標識抗ヒトGBP28モノクローナル抗体溶液

・ペルオキシダーゼ標識抗ヒトGBP28モノクローナル抗体原液

抗ヒトGBP28モノクローナル抗体をペプシン処理及び還元処理することによりFab'フラグメントとし、これにマレイミド化ペルオキシダーゼを結合させた。濃度は280、403nmの吸収より抗ヒトGBP28モノクローナル抗体のFab'部分とペルオキシダーゼ部分の各々の濃度を求め、合計することにより算出した。

・標識抗体希釈溶液

表 9

試薬	濃度
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	16mM
BSA	1.0%
pH6.5	—

ペルオキシダーゼ標識抗ヒトGBP28モノクローナル抗体溶液を上記組成の標識抗体希釈溶液にて希釈し標識抗体濃度を350ng/mLとし、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトGBP28モノクローナル抗体溶液とした。

(4) 濃縮洗浄液 (用時精製水にて20倍希釈する)

表 10

試薬	濃度
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	40mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	60mM
Tween 20	1.0%
pH6.5	—

(5) 基質液

市販のELISA用TMB(テトラメチルベンチジン)溶液を用いた。

(6) 反応停止液

0.36N H_2SO_4 を用いた。

B. アッセイ・プロトコル

被検検体は標準液の調製に用いた希釈用緩衝液で、適切な濃度（～50ng/mL）になるまで希釈する。通常の検体は約400～500倍が適切と思われる。（例：21倍希釈を2回繰り返して、441倍希釈とする。）

1. 標準液及び被検試料を100 μ L/well入れる。
2. プレート攪拌機で5～10秒程度攪拌した後、遮光、室温で60分間静置。
3. 標準液及び被検試料を除き、洗浄液にて4回洗浄。
4. ペルオキシダーゼ標識抗体溶液を100 μ L/well入れる。
5. プレート攪拌機で5～10秒程度攪拌した後、遮光、室温で30分間静置。
6. ペルオキシダーゼ標識抗体溶液を除き、洗浄液にて4回洗浄。
7. 基質液を100 μ L/well入れる。
8. プレート攪拌機で5～10秒程度攪拌した後、遮光、室温で30分間静置。
9. 反応停止液を100 μ L/well入れる。
10. プレート攪拌機で5～10秒程度攪拌した後、各wellの吸光度を測定。

（測定波長：450/650nm（主/副）、検量線近似式：二次式）

〔実施例6〕 検量線の作成

調製した0、2、5、10、25、50 ng/mLのGBP28標準液をサンプルとして測定し、検量線を確認したところ、図3に示すように、ほぼ直線の検量線が得られた。血液中のGBP28の平均濃度は10 μ g/mLであるため、検体は21倍希釈を2回行った441倍希釈で測定することとした（測定範囲：0～22 μ g/mL）。

〔実施例7〕 同時再現性試験

キット測定値の変動を評価するために、3種類の血清サンプルを用いて、各々24回ずつ測定した。その結果、表11に示すように、CV値はいずれも5%以下と満足できる結果であった。このことから、当キットの測定値に対する信頼性を得ることができた。

表 1 1

GBP28 アッセイの同時再現性

GBP28 (ug/mL)			
	A	B	C
1	4.95	8.25	15.26
2	5.93	8.59	13.61
3	5.82	6.64	14.82
4	5.63	8.11	12.99
5	5.86	7.93	14.59
6	5.96	7.67	13.34
7	5.55	7.50	14.56
8	5.46	7.78	13.53
9	5.55	7.47	14.70
10	5.62	7.92	13.48
11	5.17	7.97	13.59
12	5.80	7.48	15.00
13	5.94	8.15	14.29
14	5.39	7.99	15.04
15	5.84	7.78	14.22
16	5.46	7.82	14.22
17	5.53	8.09	14.59
18	5.85	7.68	14.01
19	6.01	7.75	14.32
20	5.88	8.18	14.88
21	5.63	7.83	13.13
22	5.80	8.28	15.15
23	6.21	8.41	15.33
24	5.82	8.08	14.80
N	24	24	24
MAX.	6.21	8.59	15.33
MIN.	4.95	6.64	12.99
MEAN	5.694	7.889	14.309
S.D.	0.2762	0.3834	0.6883
C.V.	4.8%	4.9%	4.8%

〔実施例 8〕 日差再現性試験

キット測定値の日差変動を評価するために、5種類の血清サンプルを用いて、各々5回ずつ5日に分けて測定を行った。その結果、表12に示すように、5日間の測定値のバラツキはCV 3.3～6.8%と満足できる結果であった。このことから、当キットの測定値に対する信頼性を得ることができた。

表 1 2

GBP28 アッセイの日差再現性

	GBP28 (μg/mL)				
	A	B	C	D	E
1	7.67	5.88	5.38	15.98	11.91
2	8.24	5.61	5.37	16.19	12.12
3	8.08	5.85	6.00	14.58	11.49
4	8.44	6.00	5.72	15.88	11.86
5	7.26	5.32	4.89	14.93	11.04
N	5	5	5	5	5
MAX.	8.44	6.00	6.00	16.19	12.12
MIN.	7.26	5.32	4.89	14.58	11.04
MEAN	7.937	5.730	5.471	15.514	11.684
S.D.	0.4220	0.2432	0.3736	0.6366	0.3835
C.V.	5.3%	4.2%	6.8%	4.1%	3.3%

[実施例 9] 希釈試験

診断薬キットでは、血清成分の反応系への影響をさける目的で、血清サンプルを通常希釈してアッセイに用いる。そのため、至適な希釈倍率であるかどうかを確認するために、所定濃度のサンプルを適宜希釈して測定し、得られた値がグラフ上で直線を描くかどうかを確認する。直線が描ければ、標準液と同等の性能を得たことになり測定値に血清成分の影響がないと判断する。

そこで、3種類の血清サンプルをアッセイプロトコルに従って441倍に希釈し、さらにそのサンプルを1/5～5/5まで希釈して各々2回ずつ測定した。その結果、表13及び図4に示すように、いずれの検体においても良好な直線性が得られたことから、当キットの希釈倍率に支障がないことが確認された。

表 1 3

GBP28 アッセイの希釈直線性

血清 1

希釈 (/5)	GBP28 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	GBP28 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	GBP28 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
	血清1	血清2	血清3
1	1.54	1.00	2.88
1	1.59	1.05	3.00
2	2.73	2.28	6.41
2	2.99	2.03	6.05
3	4.36	3.24	9.63
3	4.08	3.21	8.75
4	6.43	4.60	12.34
4	5.88	4.25	11.28
5	7.45	5.20	15.04
5	7.68	5.32	13.88

〔実施例 10〕 添加回収試験

血中に存在するタンパク質は単離されたタンパク質と異なり、さまざまな血中に存在する他のタンパク質や物質と複合体を構成する場合や立体構造に変化をきたす場合がある。そのため、単離されたタンパク質を濃度調製した標準品では良好な評価結果が得られていても、血清などをサンプルとした場合に、正確な濃度が測定されていない場合がある（例えば、複合体が形成されることにより、抗体に対するエピトープが失われるなど）。

そこで、サンプル血清に適当な濃度に調製されたGBP28標準液を添加したものをサンプルとして測定した。続いて、得られた値から標準品添加前のサンプル濃度を差し引いた値を、添加した量で割ることにより回収率として求めた。その結果、表 1 4 に示すように、平均 95 % 程度の良好な回収率が得られたことから、当キットでは、添加した標準品が血中成分の影響を受けることなく測定されていることが証明され、血中GBP28を正確に測定できていることが確認された。

表 1 4

添加回収試験結果

血清 1

	None	A	B	C
平均値 ($\mu\text{g/mL}$)	10.34	11.85	13.98	19.90
添加量 ($\mu\text{g/mL}$)	-	1.52	3.65	9.57
回収率 (%)	-	93.4	95.6	91.9

血清 2

	None	A	B	C
平均値 ($\mu\text{g/mL}$)	13.73	15.25	17.75	23.16
添加量 ($\mu\text{g/mL}$)	-	1.52	4.02	9.43
回収率 (%)	-	93.8	105.3	90.6

血清 3

	None	A	B	C
平均値 ($\mu\text{g/mL}$)	26.36	28.13	30.56	36.88
添加量 ($\mu\text{g/mL}$)	-	1.77	4.20	10.52
回収率 (%)	-	109.1	110.1	101.1

産業上の利用可能性

本発明により、試料中のGBP28の濃度を測定することから、臨床の場合において2型糖尿病等の糖代謝異常を簡便に診断することが可能になると共に、2型糖尿病治療剤、特にチアゾリジン誘導体の治療効果をモニタリングすることが可能となった。また、本発明の抗体を用いれば、GBP28好ましくは天然型のGBP28の血中濃度を測定することが可能であり、試料中のGBP28に対して熱処理等の前処理を行わずに、GBP28を定量的に測定することができる。このことにより、測定の簡便化及び検体処理能力の改善が期待できる。

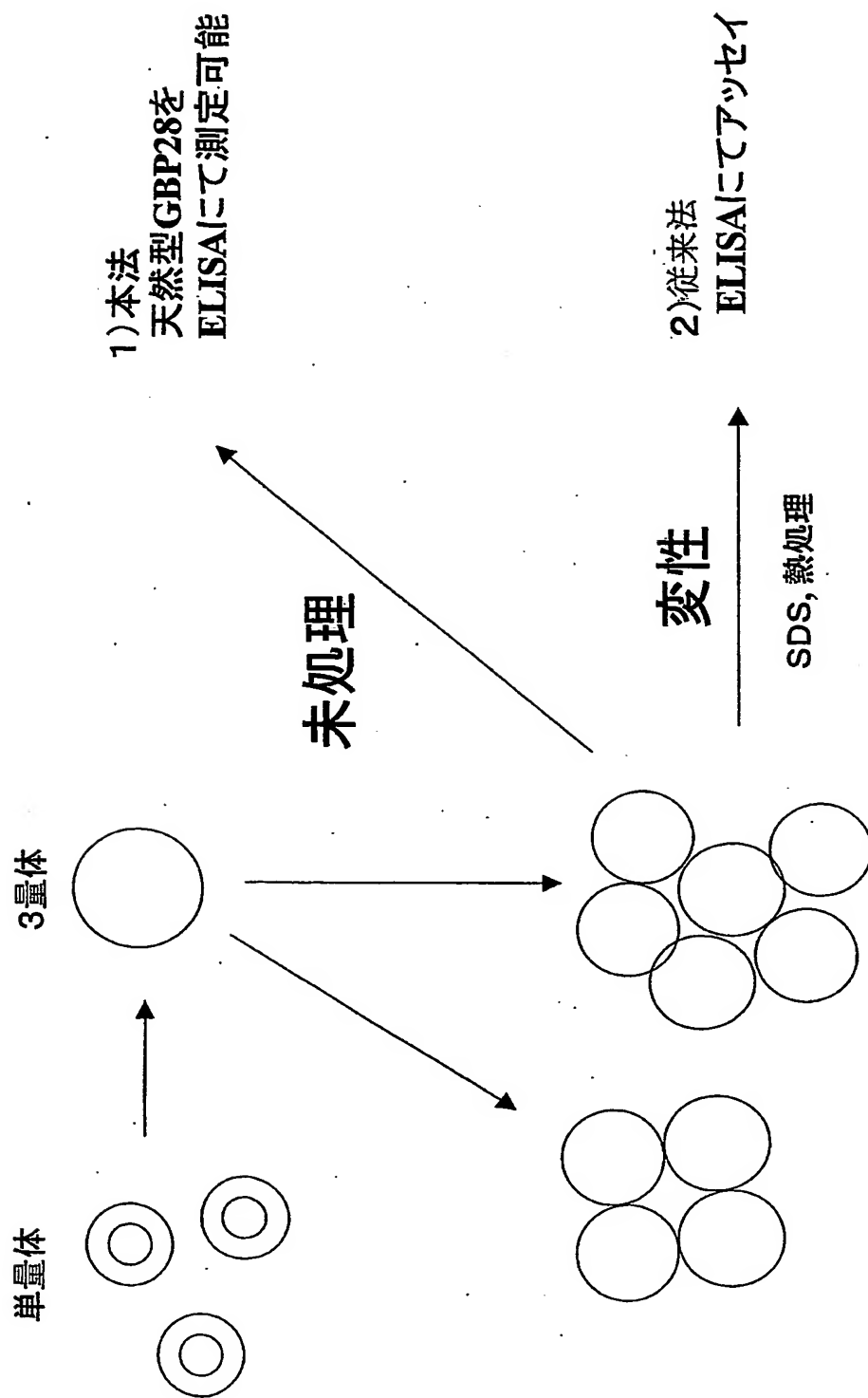
更に、本発明の方法は、大量の検体を簡便に処理できるため、糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化等インスリン抵抗性の関連する成人病に対する臨床的検査において、非常に有効な測定系を提供するものである。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請 求 の 範 囲

1. 試料中のアディポネクチン (GBP28) を測定することにより糖代謝異常を診断又はモニタリングする方法。
2. 糖代謝異常が2型糖尿病である、請求項1に記載の方法。
3. GBP28が天然型である、請求項1又は2に記載の方法。
4. 試料中のGBP28を測定することにより2型糖尿病治療剤の治療効果をモニタリングする方法。
5. GBP28が天然型である、請求項4に記載の方法。
6. 2型糖尿病治療剤がチアゾリジン誘導体である、請求項4又は5に記載の方法。
7. 抗原-抗体反応を用いて測定することを特徴とする、請求項5又は6に記載の方法。
8. 試料中の天然型GBP28を測定することを特徴とする、GBP28の測定方法。
9. GBP28の測定を、天然型GBP28に特異的に反応するモノクローナル抗体を使用して行うことを特徴とする、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。
10. ハイブリドーマFERM BP-7660またはFERM BP-7661が産生するモノクローナル抗体を使用することを特徴とする、請求項9に記載の方法。
11. GBP28の測定を、固相法、競合法、凝集法、比濁法、サンドウィッチ酵素抗体法のいずれかによって行うことを特徴とする、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。
12. 試料が、血清、血漿、関節液、胸水、組織抽出液、組織、培養上清又は尿であることを特徴とする、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。
13. GBP28の3量体構造及び／又はGBP28の3量体が凝集した構造を有する天然型GBP28に対して特異的に反応するモノクローナル抗体。
14. ハイブリドーマFERM BP-7660またはFERM BP-7661が産生するものである、請求項13に記載のモノクローナル抗体。
15. 天然型GBP28に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を含む、試料中の天然型GBP28を測定するためのキット。

図 1



血液中での存在形態

図 2

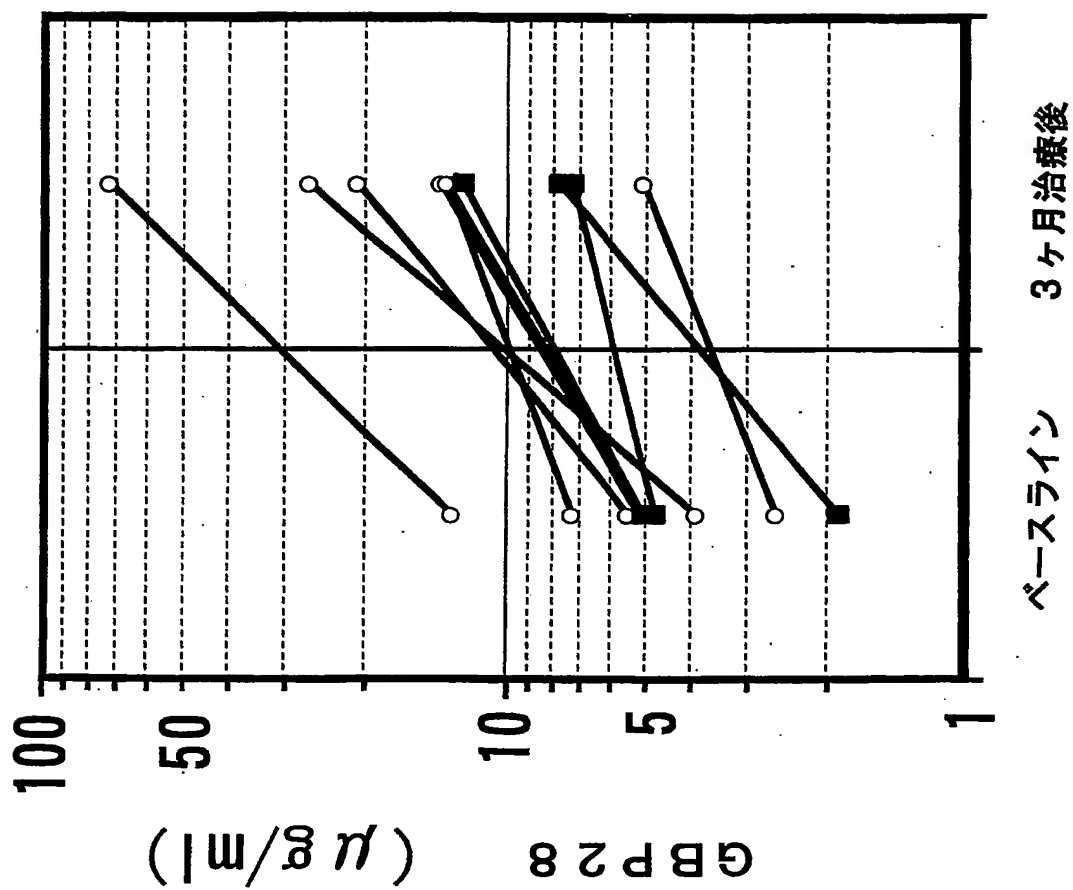


図 3

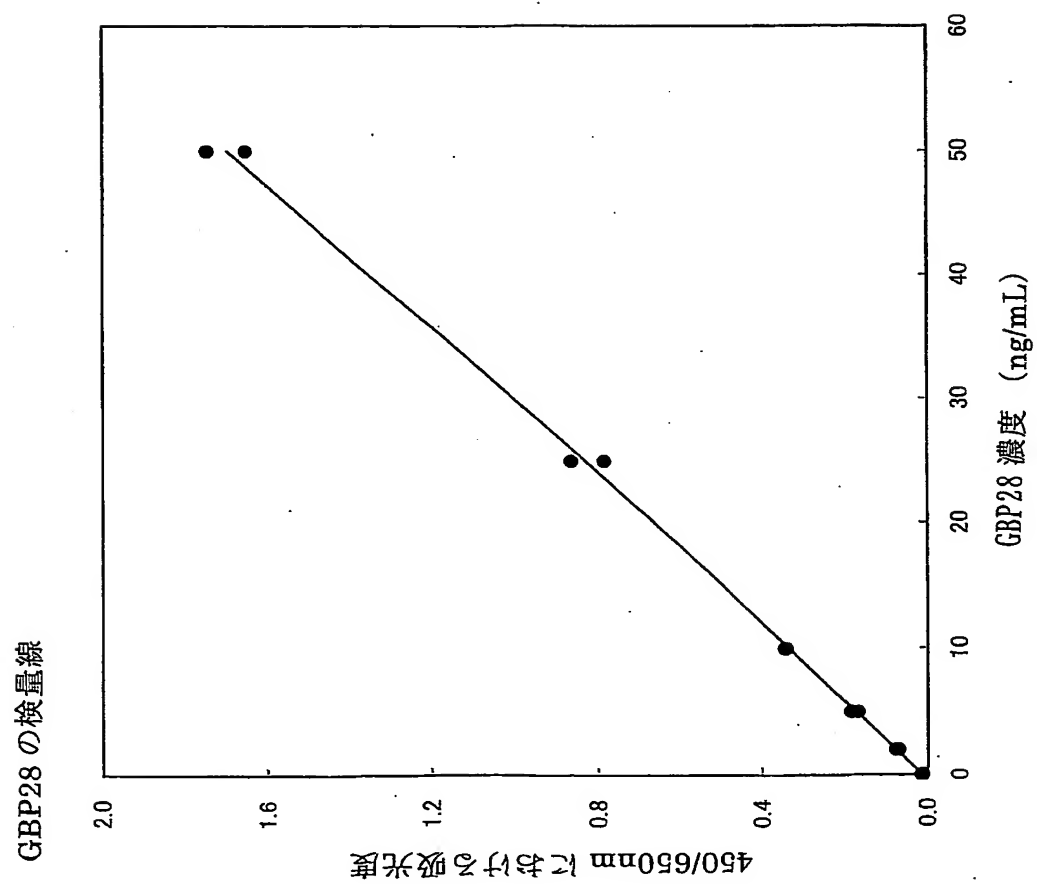
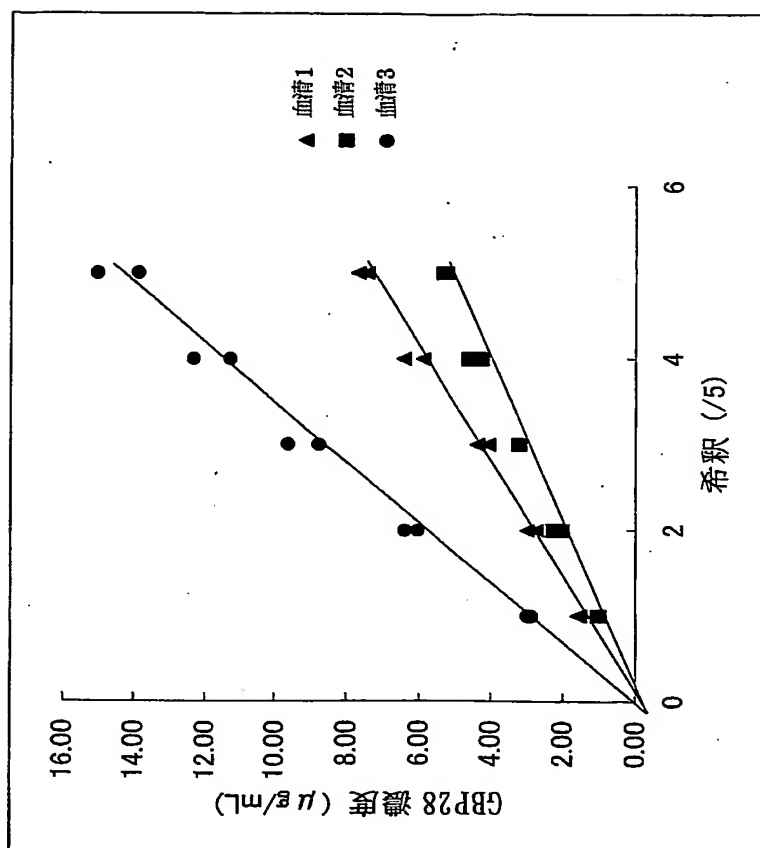


図 4



SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI DIAGNOSTICS SCIENCE CO., LTD

KEIO UNIVERSITY

<120> A METHOD FOR DIAGNOSING OR MONITORING GLYCOMETABOLIC DISORDER

<130> PH-1621-PCT

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 244

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Leu Leu Gly Ala Val Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Gly His

1

5

10

15

Asp Gln Glu Thr Thr Thr Gln Gly Pro Gly Val Leu Leu Pro Leu Pro

20

25

30

Lys Gly Ala Cys Thr Gly Trp Met Ala Gly Ile Pro Gly His Pro Gly

35

40

45

His Asn Gly Ala Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Thr Pro Gly Glu
50 55 60

Lys Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly Leu Ile Gly Pro Lys Gly Asp Ile
65 70 75 80

Gly Glu Thr Gly Val Pro Gly Ala Glu Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly
85 90 95

Ile Gln Gly Arg Lys Gly Glu Pro Gly Glu Gly Ala Tyr Val Tyr Arg
100 105 110

Ser Ala Phe Ser Val Gly Leu Glu Thr Tyr Val Thr Ile Pro Asn Met
115 120 125

Pro Ile Arg Phe Thr Lys Ile Phe Tyr Asn Gln Gln Asn His Tyr Asp
130 135 140

Gly Ser Thr Gly Lys Phe His Cys Asn Ile Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe
145 150 155 160

Ala Tyr His Ile Thr Val Tyr Met Lys Asp Val Lys Val Ser Leu Phe
165 170 175

Lys Lys Asp Lys Ala Met Leu Phe Thr Tyr Asp Gln Tyr Gln Glu Asn
180 185 190

Asn Val Asp Gln Ala Ser Gly Ser Val Leu Leu His Leu Glu Val Gly
195 200 205

Asp Gln Val Trp Leu Gln Val Tyr Gly Glu Gly Glu Arg Asn Gly Leu

210

215

220

Tyr Ala Asp Asn Asp Asn Asp Ser Thr Phe Thr Gly Phe Leu Leu Tyr

225

230

235

240

His Asp Thr Asn

<210> 2

<211> 1804

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ataaaatata acgggagggg nccataaatg cccaccaaaa aggccaggat tttntggtgt 60
 ttttctcttt ttcctaacaa agtgtttctc cccctnttc tctttttttt ttggttttgt 120
 tgtttcatgt gtcaatttaa ttacccatat caaantgtcc ccaggagagg gtagagaaga 180
 aagagaatga gagataagaa ggaggataga cacagaaaat gagagagaag ggggaaagaa 240
 aaagaggaaa ggagccagag gagagaagct ggtagcatt gaatggagca atctgtgtca 300
 tcgtacttgg gaaaccaag gatggattct tgncaagtcg actcttgag ctttcctgt 360
 gcttggtcct gtgctcagac atgggaaaat tagaggagtg tcactgtgc aatcactgaa 420
 ttcataatct tgntnaggaa anganactac acacaggga taatgctaag tattacagat 480
 ttcagggcag aaagagatca aggtgggctg caatattcag aaaagtcttc ctggaaaagt 540
 tgaatactta gaaagcagct cctagaagta gactctgctg agatggacgg agtccttgt 600
 aggtccaac tgggtgtgtg tgtgggtct gtctctccat ggctgacagt gcacatgtgg 660
 attccaataa aatataacgg gaggggncca taaatgccca ccaaaaaggc caggattttt 720

tgggtgttttt ctctttttcc taacaaagtg tttctccccc ctnttctctt ttttttttgg 780
ttttgttggt tcatgtgtca atttaattac ccatatcaaa ntgtccccag gagagggtag 840
agaagaaaga gaatgagaga taagaaggag gatagacaca gaaaatgaga gagaaggggg 900
aaagaaaaag aggaaaggag ccagaggaga gaagctggtt agcattgaat ggagcaatct 960
gtgtcatcgt acttgggaaa cccaaggatg gattcttgnc aagtcgactc ttggagcttt 1020
ccctgtgctt ggtcctgtgc tcagacatgg gaaaattaga ggagtgtcat ctgtgcaatc 1080
actgaattca taatcttgnt naggaaanga nactacacac agggaataat gctaagtatt 1140
acagatttca gggcagaaaag agatcaagggt gggctgcaat attcagaaaa gtcttcctgg 1200
aaaagttgaa tacttagaaa gcagctccta gaagtagact ctgctgagat ggacggagtc 1260
ctttgtaggt cccaactggg tgtgtgtgtg gggctctgtct ctccatggct gacagtgcac 1320
atgtggattc caggctcagg atgctgttgc tgggagctgt tctactgcta ttagctctgc 1380
ccggtcatga ccaggaaacc acgactcaag ggcccggagt cctgcttccc ctgcccagg 1440
gggcctgcac aggttggtatg gcgggcatcc cagggcattcc gggccataat ggggccccag 1500
gccgtgatgg cagagatggc acccctggtg agaagggtga gaaaggagat ccaggtaaga 1560
atgtttctgg cctctttcat cacagacctc ctacactgat ataaactata tgaagtcatt 1620
cattattaac taaggcctag acacaggag aaagcaaagc ttggcgtaat catgntcatg 1680
taagaatggt tctggcctct ttcacacag acctcctaca ctgatataaa ctatatgaag 1740
tcattcatta ttaactaagg cctagacaca gggagaaagc aaagcttggc gtaatcatgn 1800
tcat 1804

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08331

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N33/577, C07K16/18, C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N33/577, C07K16/18, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2002	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Yukio ARITA et al., "Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity", Biochem.Biophys.Res.Comm., 1999, Vol.257, No.1, pages 79 to 83	1-15
Y	Yasuko NAKANO et al., "Isolation and Characterization of GBP28, a Novel Gelatin-Binding Protein Purified from Human Plasma", J.Biochem., 1996, Vol.120, No.4, pages 803 to 812	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 November, 2002 (07.11.02)Date of mailing of the international search report
26 November, 2002 (26.11.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO2/08331

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, G01N33/577, C07K16/18, C12P21/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, G01N33/577, C07K16/18, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2002年
日本国登録実用新案公報	1994-2002年
日本国実用新案登録公報	1996-2002年

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Yukio Arita et al., "Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity", Biochem Biophys Res Commun., 1999, Vol. 257, No. 1, p79-83	1-15
Y	Yasuko Nakano et al., "Isolation and Characterization of GBP28, a Novel Gelatin-Binding Protein Purified from Human Plasma", J. Biochem., 1996, Vol. 120, No. 4, p803-812	1-15

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.11.02

国際調査報告の発送日

26.11.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

松本 征二



2J 9212

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.